



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : B03C 1/01, H01F 1/37, 1/44, G01N 33/543	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/45202 (43) Date de publication internationale: 4 décembre 1997 (04.12.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00912 (22) Date de dépôt international: 23 mai 1997 (23.05.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/06765 24 mai 1996 (24.05.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ELAISSARI, Abdel- hamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod, F-69007 Lyon (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F- 69960 Corbas (FR). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). SAUZEDDE, Florence [FR/FR]; 193, rue Marcel Mérieux, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).	(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: SUPERPARAMAGNETIC MONODISPERSED PARTICLES (54) Titre: PARTICULES SUPERPARAMAGNETIQUES ET MONODISPERSÉES (57) Abstract <p>The invention discloses superparamagnetic monodispersed particles, their method of preparation and their uses. These particles comprise: a core of a first polymer, an internal layer of a second polymer coating the core, and in which is distributed a magnetic material, and an external layer of a third polymer coating the magnetic layer, and capable of interacting with at least one biological molecule, at least the second polymer being heat sensitive and having a predetermined lower critical solubility temperature (LCST) of 15 to 65 °C.</p> (57) Abrégé <p>Particules superparamagnétiques, monodisperses, leur procédé de préparation et leurs utilisations, ces particules comprenant: un noyau à base d'un premier polymère, une couche interne recouvrant le noyau, à base d'un second polymère et dans laquelle est distribué un matériau magnétique, et une couche externe, recouvrant la couche magnétique, à base d'un troisième polymère et susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, au moins le second polymère étant thermosensible et présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 15 et 65 °C.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PARTICULES SUPERPARAMAGNÉTIQUES ET MONODISPERSÉES

La présente invention concerne des particules superparamagnétiques, monodisperses, leur procédé de préparation ainsi que leurs utilisations notamment en
5 biologie dans l'isolement de molécules biologiques.

L'état de la technique révèle des particules superparamagnétiques et monodisperses. A titre d'illustration, les documents EP-0 106 873 et EP-0 446 260 décrivent des particules superparamagnétiques et
10 monodisperses comprenant un noyau poreux à base de copolymère polystyrène/divinylbenzène dans lequel sont incorporés des grains d'oxyde de fer magnétique, et une couche externe fonctionnalisée susceptible d'interagir avec des sondes d'acides nucléiques.

15 Selon le procédé de préparation des particules décrites dans ces documents, les oxydes de fer magnétiques sont incorporés par précipitation des sels correspondants, ce qui limite la proportion de charge magnétique incorporée, et ne permet d'obtenir la charge magnétique
20 qu'en une monocouche.

Le document EP-0 585 868 décrit des particules magnétiques constituées par un noyau à base d'un premier polymère et d'une couche magnétique recouvrant le noyau constituée d'un second polymère dans lequel est distribué
25 le matériau magnétique à base de ferrite, et capable d'interagir avec un antigène ou un anticorps, le matériau magnétique étant déposé par précipitation des sels de fer.

Le matériau magnétique incorporé est directement exposé aux traitements ultérieurs des particules et il
30 s'ensuit une perte de la charge au cours de l'utilisation des particules, ce qui peut entraîner des problèmes notamment d'inhibition enzymatique et de dénaturation d'entités biologiques.

Selon l'invention, on apporte des particules qui
35 sont superparamagnétiques, qui ont une charge magnétique distribuée de manière très homogène, dont la proportion

peut varier entre 1 à 80 %, en particulier de 25 à 80 % en poids par rapport au(x) polymère(s) constituant les particules. La présente invention permet d'atteindre des proportions de charge magnétique incorporée élevées, en particulier car le procédé employé permet de répartir la charge magnétique sous forme de multicouches. Il en résulte un avantage considérable à savoir la possibilité de séparer efficacement de l'échantillon, les particules de l'invention, sans avoir recours à l'action combinée d'une autre technique de séparation, telle que la floculation.

La charge magnétique se présente sous la forme de nanoparticules qui sont incorporées dans les particules de manière substantiellement irréversible, c'est-à-dire sans perte par relargage, quels que soient les traitements ultérieurs qui leur sont appliqués, notamment dans l'échantillon, à savoir rinçages, variations de températures, de pH...

Les propriétés des particules de l'invention résultent de leur structure et composition particulières et plus précisément à la présence d'un polymère thermosensible constitutif au moins pour supporter le matériau magnétique.

Selon l'article de A. KONDO, (A. KONDO, H. KAMURA, et K. HIGASHITANI (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol., 41, 99-105) on connaît un procédé d'obtention de particules magnétiques, comprenant un noyau à base d'un premier polymère consistant en un polystyrène et dans lequel est distribué un matériau magnétique, et une couche hydrophile recouvrant le noyau, à base d'un polymère thermosensible consistant en du poly(N-isopropylacrylamide). Le procédé décrit comprend les étapes suivantes :

- selon une première étape pour l'obtention du noyau magnétique, on met en contact le matériau magnétique avec du styrène en présence d'un amorceur de polymérisation, puis

- selon une seconde étape pour l'obtention de la couche hydrophile, on met en contact le noyau obtenu avec du N-isopropylacrylamide et de l'acide méthacrylique, en présence de l'amorceur de polymérisation précédent.

5 Sur les particules ainsi obtenues, on fixe de la sérumalbumine bovine pour ensuite procéder à l'isolement d'anticorps dirigés contre la sérum albumine bovine, présents dans un échantillon.

L'inconvénient de ces particules survient à
10 l'étape de leur séparation : ces particules incorporent une faible proportion de charge magnétique et sont en outre de tailles très variables, limitant considérablement l'efficacité d'un champ magnétique appliqué pour séparer les particules. Ainsi pour assurer une séparation aussi
15 efficiente que possible de ces particules dans l'échantillon, les auteurs ont recours à une thermoflocculation selon laquelle on augmente la température de l'échantillon, qui intervient pour compléter l'action d'un champ magnétique.

20 La nécessité d'une technique de séparation complémentaire résulte des particules obtenues qui présentent les inconvénients suivants :

- proportions de charge magnétique incorporée faibles,
- 25 - répartition non homogène de la charge magnétique, et
- obtention de particules non monodisperses.

Les particules de l'invention sont destinées à l'isolement de molécules biologiques, essentiellement par
30 l'application d'un champ magnétique, indépendamment de toutes variations de température, pH, force ionique.

Les particules superparamagnétiques et monodisperses de l'invention ont une taille prédéterminée comprise entre 0,1 et 10 μm et comprennent :

- 35 - un noyau à base d'un premier polymère,

- une couche interne dite couche magnétique, recouvrant le noyau, à base d'un second polymère et dans laquelle est distribué un matériau magnétique, et

5 - une couche externe, dite couche d'encapsulation, éventuellement fonctionnalisée, recouvrant la couche magnétique, à base d'un troisième polymère et susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique,

10 au moins le second polymère étant thermosensible et présentant une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 15 et 65°C, et de préférence entre 25 et 50°C.

Avantageusement, le second polymère est obtenu par polymérisation de (1) un monomère hydrosoluble, 15 d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, tel que le N-isopropylacrylamide (NIPAM), (2) au moins un agent de réticulation, tel que le N,N-méthylène bisacrylamide, et (3) au moins un monomère fonctionnel, cationique et hydrosoluble, différent du monomère (1), tel que chlorure 20 de 2-aminoéthyl-méthacrylate. Un second polymère préféré est le PNIPAM [poly-(N-isopropylacrylamide)].

Le premier polymère peut être identique au second polymère ou différent du second polymère, dans ce dernier cas le premier polymère sera de préférence un polymère à 25 caractère hydrophobe, et en particulier un polystyrène ou un polyméthacrylate de méthyle.

Le troisième polymère est un polymère compatible avec le second polymère et est choisi parmi les polymères hydrophiles, en particulier les dérivés acrylamides et de 30 préférence le PNIPAM. Lorsque ce troisième polymère est fonctionnalisé, il porte un ou plusieurs groupes fonctionnels choisis parmi les fonctions carboxylique, aldéhydique, thiol et amine.

Un second objet de l'invention est un procédé 35 d'obtention de particules telles que définies précédemment, qui comprend les étapes suivantes :

- selon une étape (a) dite étape d'obtention du premier polymère, on obtient par polymérisation du ou des monomères appropriés, le premier polymère,

5 - selon une étape (b) dite étape d'obtention du second polymère, on obtient un sol du second polymère, par polymérisation en phase aqueuse de (1) un monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un monomère fonctionnel, cationique et hydrosoluble,
10 différent du monomère (1),

- selon une étape (c) dite d'adsorption du matériau magnétique, on met en contact le matériau magnétique avec les premier et second polymères, à une température inférieure à la LCST du second polymère,

15 - selon une étape (d) dite d'obtention de la couche magnétique, on porte le mélange réactionnel obtenu selon (c) à une température supérieure à la LCST du second polymère,

- selon une étape (e) dite d'encapsulation, on
20 met en contact, en phase aqueuse, le mélange obtenu selon (d) avec le ou les monomères appropriés pour l'obtention par polymérisation du troisième polymère.

Les étapes (a) et (b) sont, selon une variante du procédé, effectuées simultanément, en particulier mais de
25 manière non limitative quand le premier polymère est identique au second polymère.

Pour l'étape (b) et éventuellement l'étape (a) les réactifs de polymérisation sont de préférence sélectionnés comme suit :

30 - le monomère (1) est de préférence choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides, en particulier parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-

35

propylacrylamide, le monomère (1) étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM),

- le ou les monomères fonctionnels (3) sont choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le
5 chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinyl-pyridine, les dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiuronium, et éventuellement

- l'agent de réticulation (2) est hydrosoluble
10 et est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate.

Pour l'étape (c), l'adsorption du matériau magnétique sur le second polymère résulte d'interactions électrostatiques entre des particules de charges opposées.
15 Le milieu réactionnel pour l'adsorption est une phase aqueuse dont les paramètres force ionique et pH sont contrôlés.

L'invention concerne en outre les applications des particules définies ci-dessus. Ainsi les particules sont
20 notamment utilisables pour capturer puis séparer, dans un échantillon liquide, au moins une molécule biologique, notamment choisie parmi les protéines, les anticorps, les fragments d'anticorps, les antigènes, les polypeptides, les enzymes, les haptènes, les acides nucléiques et les
25 fragments d'acides nucléiques. La ou les molécules biologiques sont fixées sur les particules par adsorption ou par liaison covalente, directement ou indirectement, et dans ce dernier cas, par l'intermédiaire d'un ligand par exemple.

30 Des exemples d'utilisations particulières des particules de l'invention sont les suivantes :

- utilisation comme traceur après concentration magnétique sur une phase solide :

dans ce cas, la particule est comptée après
35 balayage de la surface par une pointe de microscope de force atomique ou après observation microscopique directe,

ou avec une caméra ; les particules magnétiques peuvent être détectées du fait de leur charge métallique et mesurées avec un magnétomètre ou tout système de type lecteur de carte de crédit ; pour faciliter la
5 concentration des particules sur la surface, un aimant permanent ou un électroaimant peut être disposé au-dessous ou au-dessus de la surface utilisée pour la détection ; la concentration magnétique sera préférentiellement effectuée si l'on utilise un nombre limité de particules, par
10 exemple la quantité suffisante pour recouvrir une à dix fois la surface si le processus est statique et une quantité éventuellement plus importante si la concentration est dynamique par circulation contrôlée de liquide sur la surface réactive ;

15 - utilisations des particules couplées à un ligand biologique approprié dans un protocole réactionnel d'agglutination ; la taille des particules peut être suivie directement dans le milieu ou après attraction magnétique ;

20 - utilisation des particules pour vectoriser des réactifs dans un dispositif de type capillaire, un jeu d'électroaimants permettant le déplacement des particules ;

- utilisation des particules pour créer des
25 voies préférentielles et/ou obstruer des canaux de distribution de liquide ;

- utilisation des particules pour transporter jusqu'à leurs cibles des substances thérapeutiques :

le principe actif est adsorbé ou transitoirement
30 couplé par covalence sur la surface de la particule, un champ magnétique approprié est appliqué pour entraîner le déplacement de l'ensemble particule-substance thérapeutique.

Un autre objet de l'invention est un procédé pour
35 isoler, dans un échantillon liquide, au moins une molécule biologique, selon lequel :

- on dispose de particules selon l'invention,
 - on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules, par incubation,
 - on applique un champ magnétique au mélange
- 5 obtenu,
- on sépare les particules de l'échantillon.

Bien entendu, la séparation des particules qui fait l'objet de ce dernier procédé est différente de la séparation des molécules biologiques comprise dans la

10 notion d'isolement. Il s'agit dans le premier cas de séparer de l'échantillon liquide, les particules sur lesquelles est fixée la ou les molécules biologiques, par action d'un champ magnétique.

Enfin un dernier objet de l'invention est un

15 réactif pour l'isolement de molécules biologiques comprenant une dispersion en milieu aqueux de particules telles que définies précédemment.

Avant de décrire plus en détails la présente invention, certains termes employés dans la description

20 sont définis.

Par particules superparamagnétiques, on entend des particules contenant des particules d'un matériau magnétique, garantissant, après suppression du champ magnétique, l'absence de toute aimantation rémanente.

25 Par particules monodisperses, on comprend des particules ayant sensiblement la même taille, et plus précisément dont la taille varie de 5 % au plus par rapport à une taille moyenne donnée et choisie.

L'expression "isoler une molécule biologique"

30 selon l'invention, comprend la séparation, la détection, d'une molécule biologique, l'enrichissement d'une fraction en une molécule biologique, selon une méthode d'isolement spécifique ou aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative, de manière directe ou indirecte par exemple

35 par l'intermédiaire d'un ligand fixé sur les particules.

**EXEMPLE 1 : PREPARATION DU PREMIER ET DU SECOND
POLYMERES**

1) Le premier et le second polymères sont
différents, le premier est un polystyrène, le second est
le PNIPAM

Les préparations détaillées ci-après ont utilisées
la polymérisation radicalaire en milieu hétérogène, à
partir des réactifs de départ suivants :

- pour le premier polymère : le monomère est le
styrène (St) (Janssen),

- pour le second polymère :

le monomère (1) est le N-isopropylacrylamide
(NIPAM) (Kodak),

l'agent de réticulation est le N-N méthylène
bisacrylamide (MBA) (Aldrich),

le monomère (3) fonctionnel est le chlorure de 2-
aminoéthyl méthacrylate (AEM) (Kodak),

l'amorceur de polymérisation est le chlorure de
2,2'-azobis amidino propane (V50) (Wako), et du NaCl a été
utilisé pour ajuster la force ionique.

1.1) Polymérisation en réacteur fermé (batch)

Tous les monomères précités sont introduits dans
le réacteur avant le début de la réaction de
polymérisation avec les autres réactifs et sans ajout
ultérieur. Cette méthode s'avère très efficace pour la
copolymérisation d'un mélange de monomères hydrophobes et
hydrophiles, car le monomère hydrophobe (St) forme
principalement le noyau et le monomère hydrophile (NIPAM)
forme la couche recouvrant le noyau, si la polymérisation
a lieu dans la phase aqueuse.

La synthèse est effectuée dans un réacteur de 250
ml sous agitation constante à 200 tours/minutes et sous
atmosphère inerte d'azote. L'eau utilisée, bouillie et
dégazée sous azote pendant deux heures, est introduite
dans le réacteur thermostaté à 70°C et laissée sous un

léger courant d'azote pendant 15 minutes, afin d'éliminer toutes traces d'oxygène. Les monomères (St, NIPAM) sont introduits et dégazés pendant encore 15 minutes avant d'ajouter l'amorceur V50.

5

Formulation du mélange réactionnel :

	<u>Réactifs</u>	<u>Masse</u>
	Eau	200 ml
	St	18 g
10	NIPAM	2,06 g
	V50	0,2053 g

Caractéristiques de la dispersion colloïdale obtenue:

	(a) diamètre à 20°C	376 nm
15	(b) diamètre à 50°C	330 nm
	(c) diamètre par MET	326 nm
	(d) densité de charge	10 mmol/g

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 50°C

20 (c) diamètre mesuré en microscopie électronique à transmission

(d) densité de charge exprimée en mmole(amine)/g de polymère.

1.2) Polymérisation sur semence

Cette méthode consiste à introduire le ou les
25 monomères (1) et/ou (3) dans un réacteur contenant la dispersion colloïdale 1.1) déjà constituée et parfaitement caractérisée, en présence du réticulant MBA. Le ou les monomères (1) et/ou (3) peuvent être additionnés sur la semence, en une seule étape ou en semicontinu.

30 La réaction de polymérisation est faite dans un réacteur de 100 ml, à une température de 70°C, sous une agitation de 200 tours/minutes. La durée de la réaction de polymérisation est de 19 heures.

35

Formulation du mélange réactionnel identifié sous la référence (PS131/132) :

	Réactifs	Masse (g)
5	Polymère selon 1.1	1,26
	NIPAM	0,77
	MBA	0,06
	AEM	0,06
	V50	0,018
	Caractéristiques du sol obtenu:	
10	(a) diamètre à 20°C	610 nm
	(b) diamètre à 50°C	450 nm
	(c) diamètre par MET	305 nm
	(d) densité de charge	19 mmol/g
	(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C.	
15	(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 50°C.	
	(c) diamètre mesuré en Microscopie électronique.	
	(d) densité de charge exprimée en mmole(amine)/g de polymère.	

2) Les premier et second polymères sont identiques et sont le PNIPAM

Les réactifs de départ sont ceux qui ont été choisis dans 1) pour le second polymère.

2.1) Polymérisation en batch (ou procédé en réacteur fermé)

Le monomère (1) (NIPAM), le monomère (3) fonctionnel (AEM) et l'agent de réticulation (MBA) sont introduits ensemble en une seule étape avant que la polymérisation ne soit amorcée par addition de l'amorceur (V50). La durée de polymérisation est de 30 min.

Formulation du polymère obtenu identifié sous la référence PNIPAM42 :

	Volume total d'eau	250ml
	bouillie et dégazée	
5	NIPAM	48,51 mmoles
	MBA	3 mmoles
	AEM	0,48 mmoles
	V50	0,30 mmoles
	Température	70°C
10	Les caractéristiques du polymère obtenu après polymérisation sont reportées dans le tableau suivant :	
	diamètre ^(a) DDL 20°C à 20°C	292 nm
	diamètre ^(b) taille DDL à 40°C	164 nm
	diamètre ^(c) MET	129 nm
15	concentration en AEM ^(d)	14,1 μ mole/g
		de polymère
	LCST ^(e)	31,5°C
	CCC ^(f) à 20°C	1,00 mole/l

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C

20 (b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C

(c) diamètre mesuré en Microscopie électronique

(d) densité de charge exprimée en mmole(amine primaire)/ g de polymère

(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée par mesure de turbidité en fonction de la température

25 (f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C.

2.2) Polymérisation en semi-continu

Le monomère (3) est introduit en deux étapes, à 3 min et à 6 min respectivement, dans le réacteur renfermant déjà le monomère (1), l'agent de réticulation (2) MBA et l'amorceur V50, en cours de polymérisation. Cet ajout peut être effectué à une vitesse d'injection constante (polymérisation par ajout continu) ou bien suivant un ajout bien contrôlé à des intervalles réguliers (polymérisation en semi-continu). Le but de cette méthode de polymérisation est d'augmenter l'incorporation de

monomère(s) (3) fonctionnel(s) sans augmenter le pourcentage de polymère hydrosoluble dans le milieu réactionnel.

- 5 Formulation du polymère obtenu identifié sous la référence PNIPAM45 :

	Volume total d'eau	250ml
	bouillie et dégazée	
	NIPAM	48,51 mmoles
10	MBA	3 mmoles
	AEM	0,48 mmoles
	V50	0,30 mmoles
	Température	70°C
	Ajouts	entre 3 et 6 min

- 15 Les caractéristique du polymère PNIPAM45 obtenu après polymérisation sont reportées dans le tableau suivant :

	diamètre(a) DDL 20°C à 20°C	823 nm
	diamètre(b) taille DDL à 40°C	530 nm
20	diamètre(c) MET	327 nm
	concentration en AEM(d)	10,0 μ mole/g de polymère
	LCST(e)	32°C
	CCC(f) à 20°C	1,00 mole/l
25	(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C	
	(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C	
	(c) diamètre mesuré en Microscopie électronique	
	(d) densité de charge exprimée en mmole(amine primaire)/ g de polymère	
	(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée	
30	par mesure de turbidité en fonction de la température	
	(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C.	

2.3) Polymérisation sur semence

Cette méthode consiste à introduire le ou les
35 monomère(s) (1) et/ou (3) dans un milieu réactionnel

contenant un sol de polymère préalablement préparé selon 2.1 et parfaitement caractérisé.

Formulation du mélange réactionnel :

Un volume de 40 ml de semence 2.1 à une concentration de 4,5 g pour 100 ml est utilisé. Les réactifs ont été ajoutés dilués dans un volume de 5 ml d'eau. Les pourcentages molaires de NIPAM, de MBA et de V50 ajoutés dans la deuxième étape sont identiques à ceux de la semence selon 2.1. En revanche, la concentration en monomère (3) fonctionnel est contrôlée (augmentée ou diminuée suivant la densité de charge voulue) ; dans le cas présent 10% de AEM sont ajoutés par rapport au monomère (1) NIPAM.

Les caractéristiques du polymère identifié sous la référence PNIPAM94) qui a été obtenu suivant le mode opératoire décrit dans 2.1, sont reportées dans le tableau suivant :

	diamètre ^(a) DDL 20°C à 20°C	504 nm
	diamètre ^(b) taille DDL à 40°C	290 nm
20	diamètre ^(c) MET	176 nm
	concentration en AEM ^(d)	22,4 μ mole/g de polymère
	LCST ^(e)	32°C
	CCC ^(f) à 20°C	1,10 mole/l
25	(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 20°C	
	(b) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière à 40°C	
	(c) diamètre mesuré en Microscopie électronique	
	(d) densité de charge exprimée en mmole(amine primaire)/ g de polymère	
	(e) température critique inférieure de solubilité (LCST) déterminée	
30	par mesure de turbidité en fonction de la température	
	(f) concentration critique de coagulation (CCC) à 20°C.	

EXEMPLE 2 : SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES FERROFLUIDES IONIQUES DESTINÉS À ÊTRE INCORPORÉS DANS LA COUCHE DU SECOND POLYMÈRE

Le mode opératoire a été élaboré selon les
5 résultats énoncés dans le brevet US-4 329 241.

Les propriétés physiques des ferrofluides préparés selon ce document sont rassemblées dans le tableau récapitulatif suivant :

10	Propriétés	Valeurs	Méthodes
	diamètres (nm)	15 ± 3	FMA (microscopie à force atomique)
	et	7 ± 1	MET (microscopie électronique à transmission)
15	dispersité	$9,5 \pm 2$	aimantation (mesure de la magnétisation)
		11 ± 1	RX (rayons X)
	épaisseur de la couche non magnétique (nm)	0,1	aimantation
20	aimantation spécifique	422 kA/m	aimantation
	densité de charge (C/m ²)	1,5	conductimétrie
25	pH	7-8	pH-métrie
	conductivité	1 mS	conductimétrie

La méthode de synthèse par précipitation des oxydes de fer permet, d'après les résultats des
30 différentes méthodes de caractérisation, d'obtenir un ferrofluide anionique, stable entre pH 6 et pH 8, d'une taille de l'ordre d'une dizaine de nm et superparamagnétique. Les analyses ont été effectuées pour différents ferrofluides, obtenus avec le même mode

opératoire : les résultats obtenus sont reproductibles d'un ferrofluide à l'autre.

Les particules de ferrofluide étant chargées négativement, il est donc possible de réaliser
5 l'adsorption de ces particules sur un polymère de charge opposée (chargé positivement) via les interactions électrostatiques.

EXEMPLE 3 : ADSORPTION DE LA CHARGE MAGNETIQUE SUR 10 LA COUCHE DE SECOND POLYMERE

Le second polymère et la charge magnétique (Exemple 2) ont des charges de signe opposé, ce qui favorise une forte adsorption, principalement par interactions électrostatiques, de la charge magnétique sur
15 le polymère. La charge magnétique est placée en excès par rapport à la concentration de polymère (Exemple 1), et l'adsorption est réalisée dans des conditions telles que le taux de recouvrement de la surface du second polymère est supérieur à 30 %. Dans un flacon de 200 ml, 6,4 ml du
20 sol de polymère obtenu à l'Exemple 1 (1.2; concentration = 94,5 g/l) sont progressivement ajoutés à 29 ml de ferrofluide obtenu à l'Exemple 2 (concentration = 23 g/l). Après adsorption de la ferrite pendant 15 minutes, l'excès de ferrofluide est éliminé en plaçant le flacon sur un
25 aimant afin de séparer les particules de polymère recouvertes de ferrite. Le surnageant est éliminé, dosé et remplacé par un même volume d'eau bouillie et dégazée. Le flacon renfermant le polymère recouvert de ferrite est à nouveau placé sur l'aimant afin de vérifier qu'il ne reste
30 plus de ferrite en solution (surnageant limpide).

Le tableau présenté ci-dessus présente la quantité de ferrite adsorbée sur les particules de latex chevelu de l'exemple 1.1 :

Code	Quantité adsorbée en g/g de latex	% massique adsorbé
ENC10	6,63	45
ENC11	6,67	46
5 ENC13	4,70	40
ENC12	5,30	37
ENC16	5,00	40

EXEMPLE 4: ENCAPSULATION DES PARTICULES

10 Le procédé d'encapsulation de la charge magnétique après l'étape d'adsorption consiste à polymériser en milieu aqueux un ou plusieurs monomères avec un agent de réticulation copolymérisable, en présence d'une suspension de polymère magnétique saturée (Exemple 3). Les monomères
15 choisis peuvent être fonctionnels, et dans ce cas, présenter ainsi un intérêt pour le greffage ou l'adsorption des molécules biologiques. Cette méthode permet d'obtenir un polymère magnétique dont l'interface peut facilement être modifiée suivant les utilisations :
20 une surface hydrophobe pour l'adsorption de protéine ou hydrophile fonctionnelle pour un greffage chimique, par exemple.

Le procédé d'encapsulation décrit dans cet exemple repose sur l'utilisation d'un amorceur et d'un mélange de
25 monomères et d'agent de réticulation. 40 ml de polymère recouvert de ferrite (Exemple 3) sont introduits dans un réacteur thermostaté à 70°C. Les monomères sont ensuite introduits dans un volume de 4 ml d'eau bouillie et dégazée. Le temps de polymérisation est de trois heures à
30 compter de l'introduction de l'amorceur. Les monomères utilisés sont indiqués dans les tableaux suivants:

4.1)

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
NIPAM	0,15 g
MBA	0,0075 g
Persulfate de potassium (KPS)	0,0056 g

Les particules magnétiques obtenues ont pour références: ENC10, ENC11 et ENC13.

4.2)

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
NIPAM	0,15 g
MBA	0,015 g
Persulfate de potassium (KPS)	0,0056 g

Les particules magnétiques obtenues ont pour références: ENC12 et ENC16.

Ces particules ont été caractérisées. Ces résultats sont présentés dans les tableaux suivants :

a) Diamètre des particules magnétiques obtenues				
code	D ^(a) nm	D _n ^(b) nm	D _w ^(b) nm	IP ^(c)
ENC10	500	380	388	1,02
ENC11	810	385	388	1,006
ENC13	1500	352	363	1,030
ENC12	750	366	369	1,007
ENC16	1000	ND	ND	ND

(a) diamètre mesuré par diffusion dynamique de la lumière

(b) diamètre mesuré par microscopie électronique à transmission

(c) indice de polydispersité

ND non déterminé

b) Pourcentage massique de ferrite encapsulée dans le polymère et le temps de séparation

	code	% masse ferrite	% masse ferrite	tps de séparation min(*)
		aimantation	complexométrie	
	ENC10	35	43	<20
	ENC11	23	40	<20
5	ENC13	38	36	<20
	ENC12	16	23	<30
	ENC16	40	45	<5

(*) le temps de séparation est déterminé en utilisant un aimant GEN-PROBE, Magnetic separation unit catalog#1639, San Diego.

10

Les colloïdes obtenus sont stables, monodisperses et présentent un temps de séparation sous l'action d'un champ magnétique inférieur à 30 min, et plus particulièrement inférieur à 5 min (ENC16). Les tailles
 15 obtenues sont reproductibles d'une synthèse à l'autre, sont comprises entre 0,1 et 10 μm et la distribution en taille au sein d'une même préparation est très étroite (IP<1,03). La quantité de ferrite encapsulée est comprise
 20 désorption des particules magnétiques car il a été vérifié que la différence entre le pourcentage massique adsorbé et le pourcentage massique après encapsulation est très faible.

REVENDICATIONS

1. Particules superparamagnétiques, mono-disperses, ayant une taille prédéterminée comprise entre
5 0,1 et 10 μm , comprenant :

- un noyau à base d'un premier polymère,
- une couche interne dite couche magnétique, recouvrant le noyau, à base d'un second polymère et dans laquelle est distribué un matériau magnétique, et
- 10 - une couche externe, dite couche d'encapsulation, éventuellement fonctionnalisée, recouvrant la couche magnétique, à base d'un troisième polymère et susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique,

15 caractérisées en ce que au moins le second polymère est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 15 et 65 °C et de préférence entre 25 et 50°C.

20 2. Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que le second polymère est obtenu par polymérisation de (1) un monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un monomère
25 fonctionnel, cationique et hydrosoluble, différent du monomère (1).

3. Particules selon la revendication 2, caractérisées en ce que le second polymère est le PNIPAM obtenu par polymérisation de (1) N-isopropylacrylamide,
30 (2) de N,N-méthylène bisacrylamide et (3) chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate.

4. Particules selon la revendication 2 ou 3, caractérisées en ce que le premier polymère est identique au second polymère.

35 5. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que le premier

polymère est différent du second polymère et est un polymère à caractère hydrophobe, tel qu'un polystyrène ou un polyméthacrylate de méthyle.

5 6. Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que le troisième polymère est un polymère compatible avec le second polymère et est choisi parmi les polymères hydrophiles, en particulier les dérivés acrylamides et de préférence le PNIPAM.

10 7. Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce que le troisième polymère est fonctionnalisé et porte un groupe fonctionnel choisi parmi les fonctions carboxylique, aldéhydique, thiol et amine.

15 8. Particules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles sont de forme essentiellement sphérique.

9. Procédé d'obtention de particules telles que définies selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que :

20 - selon une étape (a) dite étape d'obtention du premier polymère, on obtient par polymérisation du ou des monomères appropriés, le premier polymère,

- selon une étape (b) dite étape d'obtention du second polymère, on obtient un sol du second polymère, par
25 polymérisation en phase aqueuse de (1) un monomère hydrosoluble, d'acrylamide ou d'un dérivé d'acrylamide, (2) au moins un agent de réticulation et (3) au moins un monomère fonctionnel, cationique et hydrosoluble, différent du monomère (1),

30 - selon une étape (c) dite d'adsorption du matériau magnétique, on met en contact le matériau magnétique avec les premier et second polymères, à une température inférieure à la LCST du second polymère,

- selon une étape (d) dite d'obtention de la
35 couche magnétique, on porte le mélange réactionnel obtenu

selon (c) à une température supérieure à la LCST du second polymère,

- selon une étape (e) dite d'encapsulation, on met en contact, en phase aqueuse, le mélange obtenu selon (d) avec le ou les monomères appropriés pour l'obtention par polymérisation du troisième polymère.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on effectue simultanément les étapes (a) et (b).

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le premier polymère est identique au second polymère.

12. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que le premier polymère est différent du second polymère et est un polymère à caractère hydrophobe, tel qu'un polystyrène ou un polyméthacrylate de méthyle.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que pour l'étape (b) et éventuellement l'étape (a), le monomère (1) est choisi parmi les N-alkylacrylamides et les N,N-dialkylacrylamides.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le monomère (1) est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, N-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le monomère (1) étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, caractérisé en ce que pour l'étape (b) et éventuellement l'étape (a), le ou les monomères fonctionnels (3) sont choisis parmi les dérivés acryliques et méthacryliques, le chlorure de 2-aminoéthyl-méthacrylate (AEM), les dérivés de N-vinyl-pyridine, les

dérivés de trialkylammonium et les dérivés de chlorure d'isothiouronium.

16. Procédé selon les revendications 9 ou 10 et 11, caractérisé en ce que pour l'étape (b) et éventuellement l'étape (a), l'agent de réticulation (2) est hydrosoluble et est choisi parmi le N,N-méthylène bisacrylamide (MBA), l'éthylène glycol diméthacrylate.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, caractérisé en ce que le troisième polymère est choisi parmi les polymères hydrophiles, en particulier les dérivés acrylamides et de préférence le PNIPAM.

18. Utilisation de particules telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour isoler au moins une molécule biologique, notamment choisie parmi les protéines, les anticorps, les fragments d'anticorps, les antigènes, les polypeptides, les enzymes, les haptènes, les acides nucléiques et les fragments d'acides nucléiques.

19. Utilisation selon la revendication 18, selon laquelle on fixe sur les particules, par adsorption ou par liaison covalente, directement ou indirectement, la ou les molécules biologiques.

20. Procédé pour isoler, dans un échantillon liquide, au moins une molécule biologique, selon lequel :

- on dispose de particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,
- on met en contact ledit échantillon avec lesdites particules, par incubation,
- on applique un champ magnétique au mélange obtenu,
- on sépare les particules de l'échantillon.

21. Réactif pour l'isolement de molécules biologiques, caractérisé en ce qu'il comprend une dispersion en milieu aqueux de particules telles que définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/FR 97/00912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B03C1/01 H01F1/37 H01F1/44 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B03C H01F G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	<p>EP 0 585 868 A (NIPPON PAINT CO LTD ;FUJIREBIO KK (JP)) 9 March 1994 cited in the application see page 2, line 55 - page 3, line 15</p> <p>see page 3, line 50 - page 4, line 56 see page 5, line 31 - line 44 see page 7, line 20 - line 46; claims 1,3,9</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1</p> <p>2,4,9, 13,14, 18,19,21</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 August 1997

Date of mailing of the international search report

13. 08. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Decanniere, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/FR 97/00912

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A.KONDO ET AL: "Development and application of thermo-sensitive magnetic immunomicrospheres for antibody purification" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 41, 1994, BERLIN DE, pages 99-105, XP000613881 cited in the application see page 99	1
A	WO 91 09141 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 27 June 1991 see claims 1-4,6,7,9-11,13-15 -----	1,9,18, 20,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No
PCT/FR 97/00912

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0585868 A	09-03-94	DE 585868 T	22-09-94
		ES 2052465 T	16-07-94
		JP 6231957 A	19-08-94
		JP 7092168 A	07-04-95

WO 9109141 A	27-06-91	US 5283079 A	01-02-94
		AT 148746 T	15-02-97
		AU 634631 B	25-02-93
		AU 7174691 A	18-07-91
		CA 2046894 A	15-06-91
		DE 69029908 D	20-03-97
		DE 69029908 T	22-05-97
		EP 0463144 A	02-01-92
		ES 2099156 T	16-05-97
		JP 9028397 A	04-02-97
		JP 2589618 B	12-03-97
		JP 4503968 T	16-07-92
		US 5395688 A	07-03-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No
PCT/FR 97/00912

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 B03C1/01 H01F1/37

H01F1/44

G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 B03C H01F G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 585 868 A (NIPPON PAINT CO LTD ;FUJIREBIO KK (JP)) 9 mars 1994 cité dans la demande	1
A	voir page 2, ligne 55 - page 3, ligne 15 voir page 3, ligne 50 - page 4, ligne 56 voir page 5, ligne 31 - ligne 44 voir page 7, ligne 20 - ligne 46; revendications 1,3,9 --- -/-	2,4,9, 13,14, 18,19,21

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13. 08. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Decanniere, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/00912

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	A.KONDO ET AL: "Development and application of thermo-sensitive magnetic immunomicrospheres for antibody purification" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 41, 1994, BERLIN DE, pages 99-105, XP000613881 cité dans la demande voir page 99	1
A	WO 91 09141 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 27 juin 1991 voir revendications 1-4,6,7,9-11,13-15 -----	1,9,18, 20,21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demr Internationale No

PCT/FR 97/00912

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0585868 A	09-03-94	DE 585868 T	22-09-94
		ES 2052465 T	16-07-94
		JP 6231957 A	19-08-94
		JP 7092168 A	07-04-95

WO 9109141 A	27-06-91	US 5283079 A	01-02-94
		AT 148746 T	15-02-97
		AU 634631 B	25-02-93
		AU 7174691 A	18-07-91
		CA 2046894 A	15-06-91
		DE 69029908 D	20-03-97
		DE 69029908 T	22-05-97
		EP 0463144 A	02-01-92
		ES 2099156 T	16-05-97
		JP 9028397 A	04-02-97
		JP 2589618 B	12-03-97
		JP 4503968 T	16-07-92
		US 5395688 A	07-03-95
